531 Rec'd PCT/PTO 10/031505
15 JAN 2002

23448
PATENT TRADEMARK OFFICE

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:	**Klaus Braun, et al.**
Application No.:	New U.S. National Stage Application of PCT International Application No. PCT/DE00/02346
International Filing Date:	14 July 2000
Priority Date Claimed:	16 July 1999 (German Appl. No. 199 33 492.7)
U.S. National Phase Filing Date:	Date of mailing identified below
Title:	**CONJUGATE FOR MEDIATING CELL-SPECIFIC, COMPARTMENT-SPECIFIC OR MEMBRANE SPECIFIC TRANSPORT OF ACTIVE SUBSTANCES**

EXPRESS MAIL CERTIFICATE

I hereby certify that I am mailing the attached documents to the Commissioner for Patents on the date specified, in an envelope addressed to the Commissioner for Patents, Box Patent Application, Washington, DC 20231, and Express Mailed under the provisions of 37 CFR 1.10.

Blake Crouch
Name of Person Mailing This Document


Signature

January 15, 2002
Date

EV037733335US
Express Mail Label Number

SUBMISSION UNDER 35 U.S.C. §371 OF UNITED STATES PATENT APPLICATION (NATIONAL PHASE PROCEEDINGS) BASED ON INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/DE00/02346 AND CLAIMING PRIORITY OF GERMAN PATENT APPLICATION NO. 199 33 492.7

Commissioner for Patents
Box PATENT APPLICATION
Washington, DC 20231

Sir:

10/031505
531 Rec'd PCT/PTO 15 JAN 2002

Submitted herewith for filing under the provisions of 37 CFR 1.53 and 35 U.S.C. § 371 is the above-referenced patent application, based on International Patent Application No. PCT/DE00/02346 and claiming priority of German Patent Application No. 199 33 492.7. A copy of the PCT International Application and related documents as originally filed are included. An English translation of the application as filed is also included. An untranslated International Preliminary Examination Report and International Search Report are included. A copy of a sequence listing, and computer readable disk containing same is enclosed. Also included is a Preliminary Amendment, unsigned Declaration and Power of Attorney, a check in the amount of $430.00, and a transmittal letter.

Please direct correspondence relating to this application to Steven J. Hultquist, Intellectual Property Technology Law, P.O. Box 14329, Research Triangle Park, NC 27709, and direct telephonic communications relating to this application to Marianne Fuierer at (919) 419-9350.

Respectfully submitted,

Marianne Fuierer
Registration No. 39,983
Attorney for Applicants

INTELLECTUAL PROPERTY/
TECHNOLOGY LAW
P.O. Box 14329
Research Triangle Park, NC 27709
Tel: (919) 419-9350
Fax: (919) 419-9354
Attorney Ref.: 4121-133

PCT/DE 00/02346
10/031505

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 12 SEP 2000
WIPO PCT

#2

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

DE 00/02346

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

EJKW

Aktenzeichen: 199 33 492.7

Anmeldetag: 16. Juli 1999

Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts,
Heidelberg, Neckar/DE

Bezeichnung: Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen

IPC: C 07 K, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Joost

A 9161
06/00
EDV-L

16. Juli 1999

Unser Zeichen: K 2689 - sch / msl

Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung.

Es ist bekannt, daß zelluläre Membransysteme weitestgehend impermeabel für viele Stoffe (z.B. Nukleinsäuren, Proteine, chemische Substanzen) sind, die von außen in die Zelle eingebracht werden sollen. Zum Einbringen von Nukleinsäuren können Zellmembranen durch physikalische Prozesse (Transfektion bei Eukaryonten, Transformation bei Prokaryonten) und biologische Vorgänge (Infektion) überwunden werden. Der Transformation, d.h. dem unmittelbaren Aufnehmen der nackten Nukleinsäure durch die Zelle, geht eine Behandlung der Zellen voraus. Unterschiedliche Methoden zur Erzeugung dieser "kompetenten Zellen" stehen zur Verfügung. Die meisten Verfahren basieren auf den Beobachtungen von Mandel und Higa (J. Mol. Biol. 53, S. 159-162 (1970)), die erstmals zeigen konnten, daß die Ausbeuten bei der Aufnahme von Lambda-DNA durch Bakterien in Gegenwart von Calciumchlorid ganz wesentlich gesteigert werden. Diese Methode ist erstmals von Cohen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, S. 2210-2114 (1972)) für Plasmid-DNA erfolgreich eingesetzt und durch viele Modifikationen verbessert worden. Eine andere Transformationsmethode beruht auf der Beobachtung, daß hochfrequente Wechselstromfelder Zellmembranen aufbrechen können (Elektroporation). Diese Technik läßt sich ausnutzen, um nackte DNA nicht nur in prokaryontische Zellen, sondern auch in eukaryontische Zellsysteme einzuschleusen (Weaver et al., J. Cell Biochem. 51, S. 426-435 (1993)). Zwei sehr sanfte Methoden zur DNA-Einbringung in eukaryontische Zellen wurden von Sikes et al. (Hum. Gen. Therap. 5, S. 837-840 (1994)) bzw. Yang et al. (Proc. Natl. Acad. Sci USA 87, S. 9568-9572 (1990) entwickelt. Sie beruhen auf der direkten Injektion der DNA in

einzelne Zellen (Mikroinjektion) bzw. auf dem Beschuß einer Zellpopulation mit Mikroprojektilen aus Wolfram, an deren Oberfläche die betreffende Nukleinsäure gebunden wurde ("Gene gun"). Parallel zur physikalischen Transformation von Zellen haben sich biologische Infektionsmethoden bewährt. Dazu zählen insbesondere die virale Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen (Chatterjee et al., Science 258, S. 1485-1486 (1992); Cossett and Rusell, Gene Therapy 3, S. 946-956 (1996); Bilbao et al., FASEB J. 11, S. 624-634 (1997)) sowie die über Liposomen vermittelte Lipofektion (Bennett et al., J. Drug Targeting 5, S. 149-162 (1997)). Weiter sind Standardmethoden des liposomalen Transports (Gao and Huang, Gene Therapy 2, S. 710-722 (1995); Akhtar et al., Nucl. Acid. Res. 19, S. 5551-5559 (1991)) und die Poly-L-Lysinierung (Leonetti et al., Bioconj. Chem. 1(2), S. 149 (1990) von Wirksubstanzen zu nennen, um diese in Zellen einschleusen zu können.

Trotz der oben aufgezählten Vielzahl von Methoden, die zellulären Membransysteme zu überwinden, gibt es noch keine universelle Methode, um unterschiedliche Wirkstoffe in Zellen hineinzubringen. Alle aufgeführten physikalischen und biochemischen Methoden sind artifiziell und unphysiologisch, insofern als sie nicht zellimmanente Mechanismen nutzen. Viren als Transportmittel sind zum gegenwärtigen Stand immer noch nicht sicher frei von Toxizität und oft auch nicht effektiv. Sie werden auch vom Immunsystem erkannt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, eine Möglichkeit zu entwickeln, die das gerichtete und spezifische Einschleusen von Wirkstoffen in Zellen und Kompartimente erlaubt. Es sind dabei folgende Anforderungen zu erfüllen:

- universelle Anwendbarkeit
- zell-, kompartiment- und membranspezifisches Einschleusungsverhalten
- hohe Effektivität
- geringe Immunogenität

- Minimierung des Infektionsrisikos
- ausreichend lange Verweildauer

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Gegenstände der Patentansprüche.

Von den Erfindern wurde ein Konjugat entwickelt, das die folgenden Komponenten aufweist:

- einen Transportvermittler für die Zellmembran ("P"),
- ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid ("AP"), und
- einen zu transportierenden Wirkstoff ("W").

Der Aufbau des erfindungsgemäßen Konjugats ist vorzugsweise:

P - AP - W

ganz bevorzugt mit einem Spacer ("SP"):

P - AP - SP - W

Den Transportvermittler für die Zellmembran (vorstehend mit "P" abgekürzt) stellt ein Peptid bzw. Protein dar, das die Plasmamembran überwinden kann. Die Länge dieses Peptids bzw. Proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die obige Eigenschaft aufweist. Beispiele für "P" stammen vorzugsweise aus der Penetratin-Familie (Derossi et al., 1998, Trends Cell Biol. 8, S. 84-87) oder sind Transportan bzw. Teile davon (Pooga et al., The Faseb Journal (1998), Vol. 12, S. 68 ff.). wobei solche aus der Penetratin-Familie bevorzugt sind. Ein Beispiel für "P" stellt ein Penetratin mit der folgenden Sequenz dar:

NH_2-RQIKIWFQNRRMKWKK-
(NH_2-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-)

Hergestellt wird die ausgewählte "P"-Sequenz auf biologischem Weg (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963).

Die Auswahl des Adressproteins bzw. -peptids (vorstehend mit "AP" abgekürzt) hängt davon ab, welche Membran bzw. welches Membransystem überwunden und welches Zielkompartiment der Zelle (Cytoplasma, Zellkern, Mitochondrien, Chloroplast, Endoplasmatisches Retikulum) oder der Zellorganelle erreicht werden soll. Die Länge dieses Adresspeptids bzw. -proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die Eigenschaft aufweist, einen zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transport zu gewährleisten. Für die Einbringung von Wirkstoffen, insbesondere Nukleinsäuren, werden im allgemeinen "AP" ausgewählt, die ein zell- kompartiment- oder membranspezifisches Erkennungssignal enthalten und dadurch den angehängten Wirkstoff an seinen Wirkort dirigieren. Zur Auswahl stehen "AP", die Wirkstoffe in Gegenwart oder Abwesenheit eines Membranpotentials transportieren können. Grundsätzlich ist für den Transport in das Zellkompartiment die reine Adressequenz ausreichend. Es können aber auch "AP" ausgewählt werden, die über eine zell- oder kompartimentspezifische Peptidasespaltstelle verfügen. Diese Spaltstelle liegt im günstigsten Fall innerhalb der Signalsequenz, kann aber auch an diese durch zusätzliche Aminosäuren angefügt werden, um nach Erreichen des Zielkompartiments das Abspalten der Adressequenz sicherzustellen. Hergestellt wird die ausgewählte "AP"-Sequenz auf biologischem (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryontischen oder prokaryontischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach der etablierten Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963). Beispiele für Adressproteine bzw.

-peptide sind:

Import in das ER	H_3N^+-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Reimport in das ER	H_2N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO^-
Import in Mitochondrien	H_3N^+-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu
Import in den Zellkern	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val H_3N^+-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- (= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen)
Import in Peroxisomen	H_2N-Ser-Lys-Leu-COO^-
Bindung an die Zellmembran	H_3N^+-Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys-

Weiter kann das Konjugat ggf. einen Spacer (vorstehend mit "SP" abgekürzt) enthalten, der sich vorzugsweise zwischen dem Adressprotein/-peptid und dem zu transportierenden Wirkstoff befindet. Er kann aber zusätzlich oder alternativ auch zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein vorliegen. Der Spacer dient dazu, ggf. vorhandene sterische Wechselwirkungen zwischen den Komponenten aufzuheben bzw. günstig zu beeinflussen. Der Spacer kann beispielsweise ausgewählt sein aus: Polylysin, Polyethylenglykol (PEG), Derivate der Poly-Methacrylsäure oder Polyvinylpyrrolidon (PVP).

Zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein/-peptid

ist vorzugsweise eine Redoxspaltstelle, z.B. -Cystein-S-S-Cystein-O-N-H-. Die zwischen Transportvermittler und Adressprotein entstehende Bindung ist eine Redoxkopplung (schonende zellimmanente Verknüpfung mittels DMSO; Rietsch und Beckwith, 1998, Annu. Rev. Gent 32, S. 163-84):

Cystein-**S**H **S**H-Cystein -----> Cystin-**S-S**-Cystin

Der Wirkstoff bzw. die Wirksubstanz (vorstehend mit "W" abgekürzt) unterliegt keinerlei Beschränkungen. Er ist frei wählbar, je nach Wunsch, welche Wirkung in einer Zelle erzeugt werden soll. Der Wirkstoff kann ein Diagnostikum und/oder Therapeutikum sein. Es kann auch mehr als ein Wirkstoff in dem Konjugat vorhanden sein. Der Wirkstoff kann ggf. markiert sein, z.B. radioaktiv, mit einem Farbstoff, mit Biotin/Avidin usw. Der Wirkstoff kann eine Nukleinsäure, ein Protein bzw. Peptid, eine chemische Substanz usw. sein. Beispielsweise seien genannt: cDNA, genomische DNA, vollständige Gene, regulatorische Elemente, Transkriptionsfaktoren, Molekularsonden, Oligonukleotide, mRNA, Antisense-RNA, Antisense-Oligonukleotide, Plasmide, virale DNA, synthetische Nukleotide, PNA (Peptide Nucleic Acids), einzelne Aminosäuren, Peptide, Proteine, monoklonale und/oder polyklonale Antikörper, pharmazeutische Wirkstoffe, Chemotherapeutika, Farbstoffe, Sensibilisatoren.

Die Synthese der Konjugatbestandteile "P" und "AP" erfolgt vorzugsweise synthetisch nach der Merrifield-Methode (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963) Die Ankopplung der anderen Bestandteile (z.B. Spacer und/oder Wirkstoff) daran erfolgt durch kovalente chemische Bindung. Die Einfügung der Redoxspaltstelle zwischen "P" und "AP" erfolgt auf chemischen Wege durch die oben erwähnte Redoxkopplung. Auch zwischen einem ggf. vorhandenen Spacer und dem Wirkstoff bzw. dem Adressprotein und dem Wirkstoff liegt eine kovalente Bindung vor, bevorzugt eine Säureamid-Bindung. Mögliche Alternativen sind Ether- oder Ester-Bindungen, je nach den in der zu konjugierenden Substanz vorhandenen funktionellen

Gruppe(n).

Das Konjugat wird bevorzugt in folgenden Schritten aufgebaut:

1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers (z.B. nach der Merrifield-Methode)
2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,
3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung (z.B. in Wasser/DMSO)
4) Reinigung (z.B. mittels HPLC)

Die erfindungsgemäßen Konjugate haben den Vorteil, unabhängig von Art und Größe eines Wirkstoffs, diesen in Zellen einbringen und in das gewünschte Zellkompartiment transportieren zu können. Es ist somit eine Verbesserung in Diagnostik und Therapie in Human- und Tiermedizin sowie eine Anwendung in der wissenschaftlichen Forschung zu erwarten. Insbesondere die Gentherapie kann durch die erfindungsgemäßen Konjugate einen Aufschwung erwarten, da vollständige Gene einschließlich ihrer regulatorischen Elemente transportierbar werden. Aber auch alle anderen Wirkstoffe lassen sich mit den erfindungsgemäßen Konjugaten spezifischer an den Wirkort bringen, was das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen reduziert. Es wurde gefunden, daß Konjugate bis 25 MDa in das Zellinnere einzubringen sind. Darüber hinaus kommt es oftmals zur Auslösung von Apoptose, was durchaus ein gewünschter Effekt sein kann. Die erfindungsgemäßen Konjugate zeichnen sich durch eine universelle Einsetzbarkeit aufgrund ihres zell-, kompartiment- und membranspezifischen Einschleusungsverhaltens aus.

Die Erfindung wird weiter anhand der beigefügten Figuren beschrieben:

Fig. 1: erfindungsgemäßes Konjugat

Fig. 2: Generelles Schema der Fmoc-Synthese

Fig. 3: Ergebnisse der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Messung an AT1-Zellen

A) Konjugat-Konzentration: 50 nM
Inkubationszeit: 5 Std.

B) Konjugat-Konzentration: 5 nM
Inkubationszeit: 5 Std.

C) Konjugat-Konzentration: 50 nM
Inkubationszeit: 24 Std.

D) Konjugat-Konzentration: 5 nM
Inkubationszeit: 24 Std.

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1: **Konjugat aufweisend einen Penetratin-Bestandteil, eine NLS, einen Polylysin-Spacer und Rhodamin**

Zum Aufbau des Konjugats wird auf Fig. 1 verwiesen.

Pentratin: NH_2-RQIKIWFQNRRMKWKK-

NLS (Nuclear Localisation Sequence): NH_2-PKKKRKV

Spacer (= $(Lys)_2$): $NH-CH_2-(CH_2)_3-CHNH_2-CO-NH-CH_2-(CH_2)_3-CHNH_2-CO-NH$

Die Penetratinsequenz, die NLS und der Spacer wurden nach der Standard Fmoc-Methode ("Peptide", H.-D. Jakubke, Chemie und Biologie Spektrum, Akad. Verl. 1996, ISBN 3-8274-0000-7) getrennt synthetisiert. Das generelle Schema der Fmoc-Synthese ist in Fig. 2 gezeigt. Zur Synthese der verschiedenen Komponenten-Sequenzen wird zuerst die erste Fmoc Aminosäure (käuflich erhältlich von Fa. Calbiochem GmbH, D-65796 Bad Soden) an ein unlösliches Polystyrol-Trägerharz über einen säurelabilen Linker (= para-Benzyl-oxybenzyl-alkohol-handle)

angefügt. Die Abspaltung der Schutzgruppe wird durch Behandlung des Harzes mit 20% Piperidin in Dimethylformamid erreicht. Die zweite Fmoc-Aminosäure wird unter Verwendung einer präaktivierten Spezies (z.B. in den Aminosäure-Einzelbestandteilen vorhandenen Succinimid-, Pentafluorphenylester- oder p-Nitrophenylestergruppen) oder in-situ Aktivierung angekoppelt, jeweils nachdem von der vorhergehenden Aminosäure die Schutzgruppe durch basische Behandlung entfernt worden ist. Jede weitere Aminosäure wird analog angekoppelt. Nachdem das gewünschte Peptid synthetisiert worden ist, wird dieses mittels Behandlung mit 95% Trifluoressigsäure (TFA) + 5% Scavenger (z.B. Triethylsilan) von dem Träger entfernt und die Schutzgruppen abgespalten. Die entstandenen Roh-Peptide werden durch präparative HPLC auf einer YMC ODS-A 7A S-5µm Umkehrphasensäule (20 x 250 mm) unter Verwendung eines Elutionsmittels enthaltend 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) bzw. 60% wässrigem Acetonitril (B) gereinigt. Die Peptide wurden mit einem sukzessiven linearen Gradienten von 25% B bis 60% B in 40 Minuten bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min. eluiert. Die den gereinigten Peptiden entsprechenden Fraktionen wurden lyophilisiert.

Die aufgereinigten Peptid-Komponenten werden gemeinsam mit 20%iger wässriger DMSO-Lösung über 5 Stunden bei Raumtemperatur behandelt, wodurch eine oxidative Kopplung der Komponenten resultiert. An den Spacer wird als zu transportierende Wirksubstanz, z.B. Rhodamin 110, gekoppelt. Dies erfolgt durch Säureamid-Kopplung an der freien α-Aminogruppe des Lysinspacers. Das komplette Konjugat wird anschließend mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

Beispiel 2: Einbringen eines erfindungsgemäßen Konjugats in Zellen

AT-1 und DU-145 Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, ergänzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 100 U/min. Penicillin, 100 µg/ml

Streptomycin.

Zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) läßt man AT-1 Zellen auf Objekträgern 24 Std. anwachsen. Nach Mediumwechsel mit farbstoffreiem RPMI 1640 (ohne Phenolrot) wird das Konjugat von Beispiel 1 (100 nM) mit RPMI auf die Zellen gegeben und 5, 24 bzw. 48 Std. bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wird das Konjugat-enthaltende Medium entfernt und zweimal mit 200 µl farbstoffreiem RPMI gewaschen und anschließend per FCS gemessen. Die Anregung mit dem Laser erfolgt bei 488 nm und die Emission bei 538 nm.

Das Konjugat wird auf dem Weg in den Zellkern verfolgt. Dazu wird unter dem Lichtmikroskop eine Zelle ausgewählt focusiert. Nach Focusierung und Justierung des Lasers wird in 100 µm Schritten durch die Zellen gefahren, und die Fluoreszenz wird in Form von Lichtblitzen über Photomultiplier gemessen. Dabei wandern große Moleküle und kleine Moleküle unterschiedlich schnell. Erfaßt wird die Anzahl der diffundierenden Moleküle in einem Bereich von jeweils 100 µm. So läßt sich mit der Signaldauer die Größe der diffundierten Moleküle bestimmen. Die dazugehörige Grafik ist in Fig. 3 gezeigt.

In einem weiteren Experiment wird die Kinetik, mit der das Konjugat ins Cytoplasma gelangt, mit dem gleichen Verfahren ermittelt. Die AT-1 Zellen wurden wieder 24 Std. adhäriert. Das das Konjugat enthaltende Medium wurde wie vorhergehend beschrieben eingesetzt. Allerdings wurde jetzt sofort das Fluoreszenzsignal mit der FCS gemessen.

Die FCS zeigte deutlich eine starke Anreicherung an der Zellmembran nach 5 Stunden Inkubationszeit. Eine Diffusion war nicht zu erkennen. Nach 24 Std. Inkubationszeit zeigten sich nur noch geringfügige Mengen an Konjugat in der Zellmembran. Auffällig war jetzt eine Anreicherung im Kern, die sich im Beobachtungszeitraum von 48 Std. noch verstärkte.

Zur Kontrolle wurden Konjugate eingesetzt, bei denen Rhodamin

110 entweder nur an Pentratin oder an NLS gebunden war. Diese zeigten nicht den vorstehend beschriebenen Effekt der Zellkernanreicherung. Die Konjugate wurden, falls sie überhaupt den Übertritt in die Zelle schafften, an der Zellmembran bzw. der Nuclearhülle angehalten und reicherten sich dort an.

Patentansprüche

1. Konjugat zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports, wobei das Konjugat die folgenden Komponenten aufweist:

 - einen Transportvermittler für die Zellmembran,
 - ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid, und
 - einen zu transportierenden Wirkstoff.

2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Transportvermittler ein Peptid oder Protein ist, das die Plasmamembran überwinden kann.

3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Transportvermittler aus der Penetratin-Familie stammt oder Transportan oder Teile davon ist.

4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei eines der Penetratine folgende Sequenz hat:

 NH_2-RQIKIWFQNRRMKWKK-

5. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das zell-, kompartiment- oder membranspezifische Adressprotein bzw. -peptid ausgewählt ist aus:

für Import in das ER	H_3N^+-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
für Reimport in das ER	H_2N-Lys-Asp-Glu-Leu-COO^-
für Import in Mitochondrien	H_3N^+-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-

	Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu
für Import in den Zellkern	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val
	H_3N^+-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- (= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen)
für Import in Peroxisomen	H_2N-Ser-Lys-Leu-COO^-
für Bindung an die Zellmembran	H_3N^+-Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys-

6. Konjugat nach Anspruch 5, wobei die Sequenz für den Import in den Zellkern folgende Sequenz hat:

 H_3N^+-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-

7. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Wirkstoff ausgewählt ist aus Nukleinsäuren, Proteinen/Peptiden und/oder chemischen Substanzen.

8. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Konjugat folgenden Aufbau hat:

 Transportvermittler - Adressprotein - Wirkstoff

9. Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ggf. weiter ein Spacer vorhanden ist.

10. Konjugat nach Anspruch 9, wobei sich der Spacer zwischen dem Adressprotein und dem Wirkstoff befindet.

11. Konjugat nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Spacer Polylysin, Polyethylenglykol oder Polyvinylpyrrolidon ist.

12. Verfahren zur Herstellung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-11 aufweisend die folgenden Schritte:

 1) Getrennte Peptidsynthese von "P", "AP" und ggf. des Spacers
 2) Kovalente Verknüpfung zwischen "AP" und Wirkstoff, ggf. mit einem Spacer dazwischen,
 3) Redoxkopplung des Produkts aus Schritt 2) mit "P" mittels Redoxkopplung

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Peptidsynthese gemäß der bekannten Merrified-Methode durchgeführt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die Redoxkopplung in einer wässrigen DMSO-Lösung durchgeführt wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12-14, wobei sich noch ein Reinigungsschritt anschließt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Reinigung mittels HPLC stattfindet.

17. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1-11 zum zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transport eines gewünschten Wirkstoffs.

18. Verwendung nach Anspruch 17 zum Einsatz in Diagnose und/oder Therapie.

Zusammenfassung

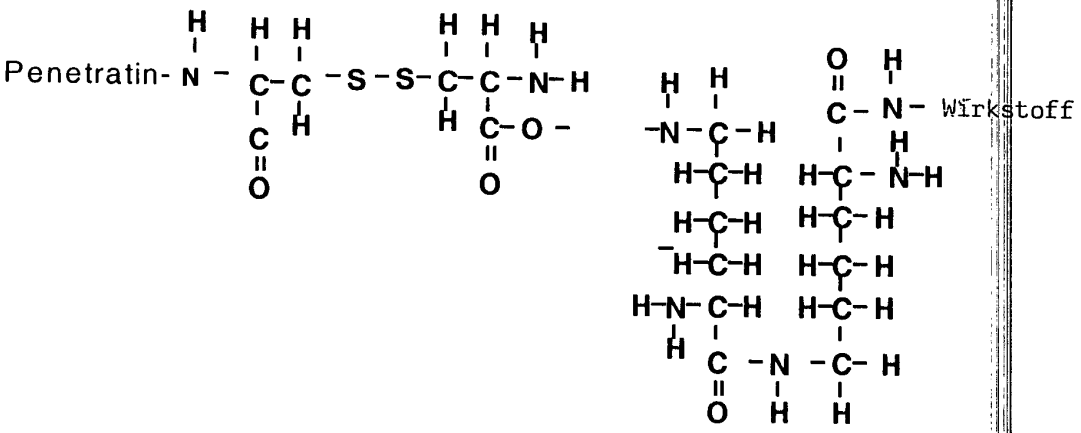
Die vorliegende Erfindung betrifft Konjugate zur Vermittlung eines zell-, kompartiment- oder membranspezifischen Transports von Wirksubstanzen. Weiter betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser Konjugate sowie deren Verwendung. Die Konjugate umfassen:

- einen Transportvermittler für die Zellmembran,
- ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Adressprotein bzw. -peptid, und
- einen zu transportierenden Wirkstoff.

PNA-Konjugat Konstrukt - Schema

Penetratin-Cy-S-S-CyONH- NLS- $NH\text{-}CH_2\text{-}(CH_2)_3\text{-}CHNH_2\text{-}CO\text{-}NH\text{-}CH_2\text{-}(CH_2)_3\text{-}CHNH_2$- CO-NH- WIRKSTOFF

Transport	Redox-Spaltung	Nukl.Loc.Sequ.	Lysin-Spacer

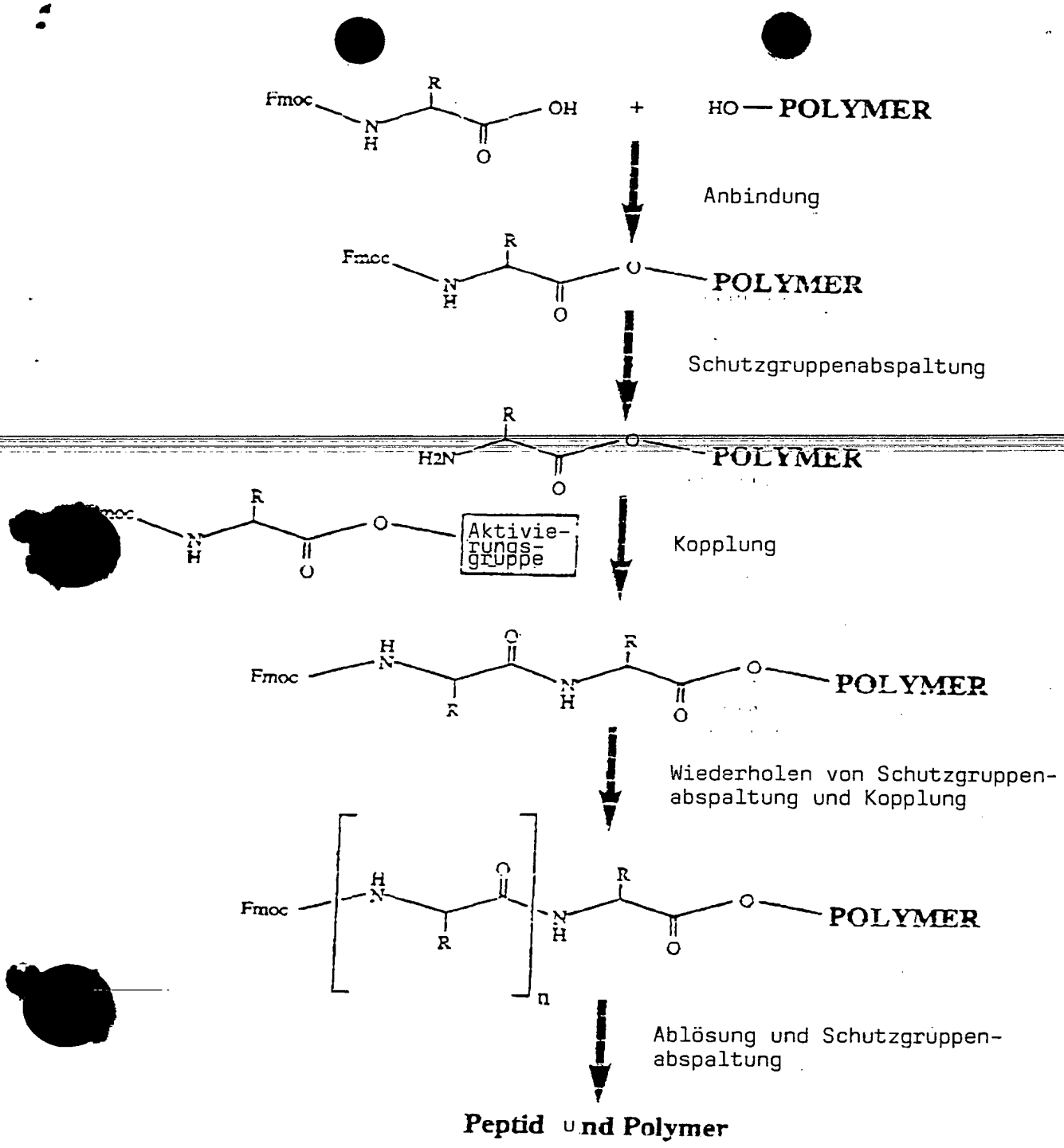


Transportprotein Cystin Redox-Trennstelle Nuklear Localisation Sequenz Spacer spezif.Sequenz

Penetratin: P: (pAntp): RQIKIWFQNRRMKWKK-

NLS: (Nucl. Localis. Signal) KKKKRKREK

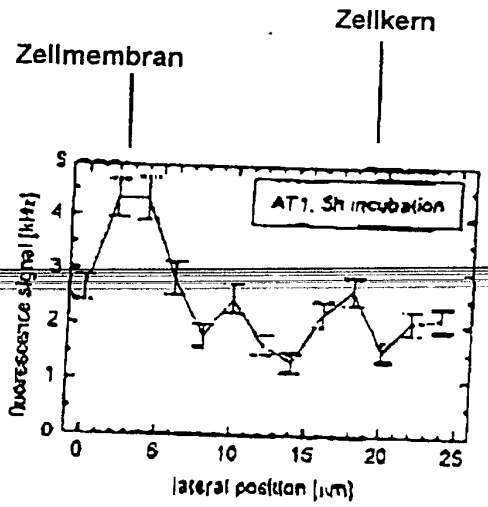
Fig. 1



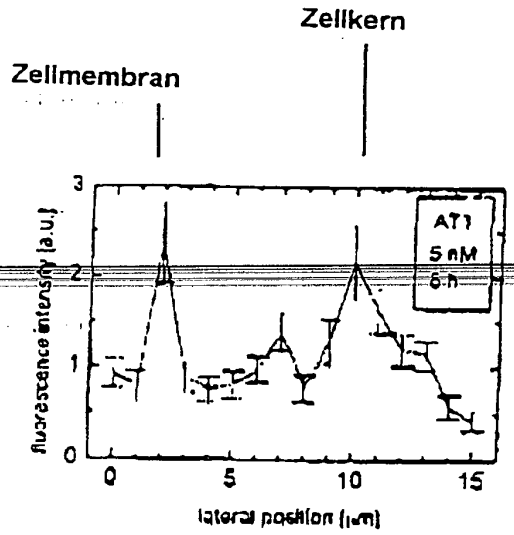
Allgemeines Schema für Fmoc Synthese

Fig. 2

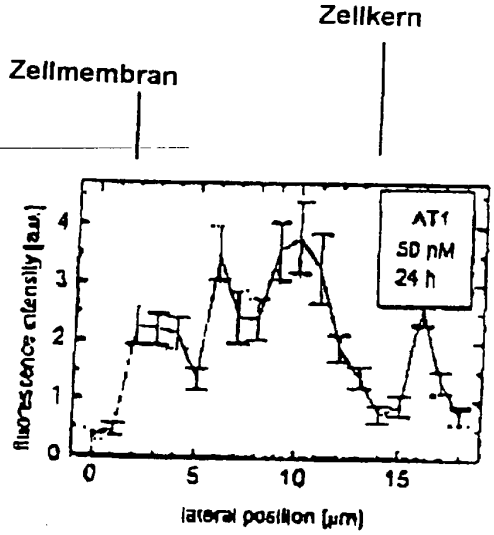
Zelluläre Aufnahme des erfindungsgemäßen Konjugats



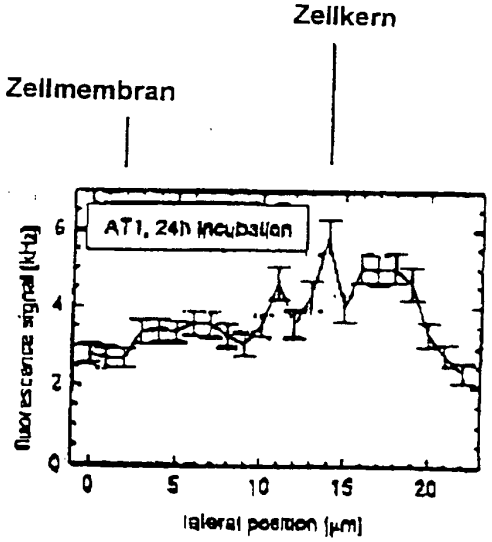
A



B



C



D

Fig. 3